

Mise au point d'une méthode de quantification microscopique et moléculaire des inoculums conidiens et ascospores de la cercosporiose jaune des bananiers

Y. CHILIN CHARLES*, H. BARDOU*, M. MONTAUBAN*, C. ABADIE*

*CIRAD, UMR BGPI, Station expérimentale de Neufchâteau, Sainte Marie, 97130 CAPESTERRE BELLE EAU, GUADELOUPE
Correspondance : yolande.chilin-charles@cirad.fr



Les cercosporioses du bananier sont considérées aujourd'hui, comme les maladies foliaires les plus dommageables pour la culture bananière.

De récentes études ont précisé la distance de dispersion des spores de *Mycosphaerella fijensis*, champignon ascomycète responsable de la cercosporiose noire. Cependant les densités et la part des deux types de spores dans les inoculums infestants demeurent très peu étudiées. Or, la mise au point de méthodes de lutte efficaces contre ces maladies foliaires à dispersion aérienne nécessite une connaissance plus précise de ces populations de spores. En Guadeloupe, nous avons entrepris sur *Mycosphaerella musicola*, agent responsable de la cercosporiose jaune, le développement de méthodes de quantification des inoculums conidiens et ascospores dans l'air.

Démarche scientifique

La caractérisation et la quantification des deux types de spores produites à l'échelle de la parcelle s'inscrivent dans l'étude et la compréhension de la dispersion de *Mycosphaerella musicola*. La méthodologie de quantification est décomposée en trois étapes successives:

- 1-La capture des spores à l'aide de piège à spores de type volumétrique
- 2-La caractérisation et la quantification directe des conidies par microscopie optique
- 3-La quantification indirecte des ascospores par PCR en temps réel

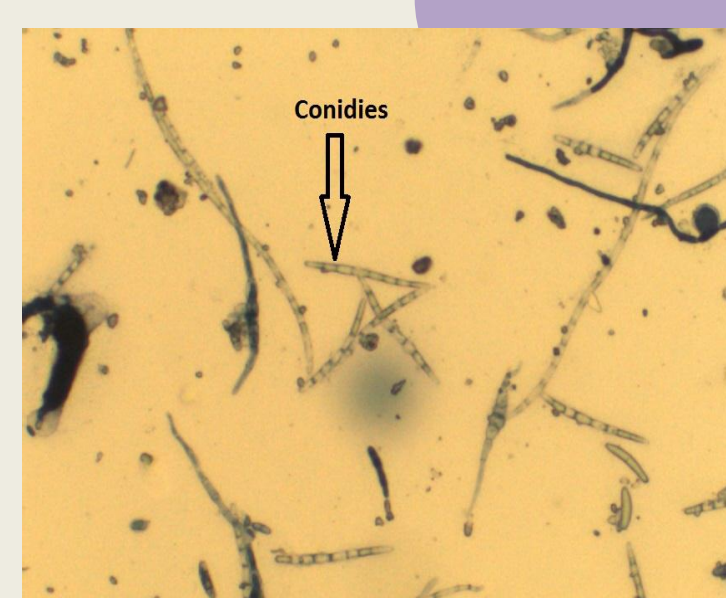
Ces étapes permettent de décrire les densités de conidies et d'ascospores/m³ air/jour.

Démarche expérimentale

1 - Capture dans l'air de l'inoculum total sur bandes gélifiées



2 - Quantification directe de l'inoculum conidien par microscopie optique



qté ADN conidien = $k_c \times \text{nb conidies} \times \text{nb moyen de cellule} \times \text{poids du noyau}$
* k_c = nb de cibles estimé pour l'ADN conidien

3 - Quantification indirecte de l'inoculum ascospore par qPCR

ADN ascospore = ADN total - ADN conidien

nb ascospores = $(\text{qté ADN ascospore} / \text{poids du noyau}) / 2k_a$
* k_a = nb de cibles estimé pour l'ADN ascospore

1 - Capture des spores

- type de piège: volumétrique Buckard
 - débit de 10 litres d'air/h
 - relevé hebdomadaire



- 3 gels de capture testés:

- Paraffine+vaseline → gel irrégulier, un comptage impossible des spores

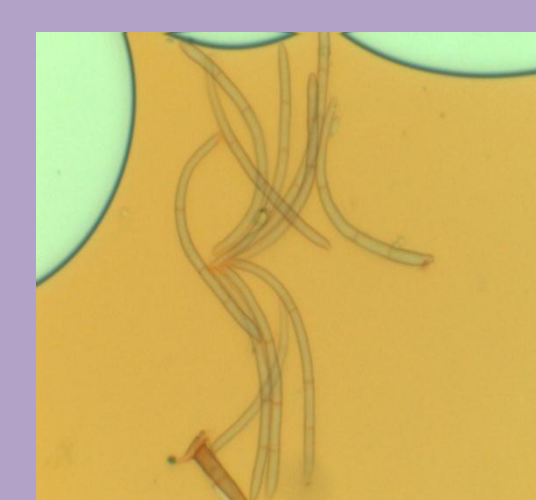
- Mowiol → gel régulier, bonne lecture microscopique

- Mowiol+bleu coton → gel régulier mais trouble donc comptage difficile des spores
→ **Gel retenu**: Mowiol avec coloration au bleu coton après capture des spores

- Découpe en bandes journalières

2 - Quantification directe des conidies

- Identification d'une technique de coloration des parois permettant compter les nombres de cellules/conidies → **Rouge Congo**



- Détermination du nombre moyen de cellules des conidies produites (calcul sur 200 conidies)

- en conditions naturelles : 3,99
→ calcul de la quantité d'ADN conidien/ bande journalière.

- in vitro: 4.76
→ estimation du rendement de l'extraction sur des bandes inoculées (2000, 200, 20 conidies)

3 - Quantification indirecte des ascospores par PCR en temps réel

(amorces disponibles; Arzanlou, 2007)

- Broyage au broyeur FastPrep[®] avec 3 types de matrice: sable, billes de 1.5mm et billes de 1.5mm+éther de pétrole
→ **matrice retenue**: billes+éther

- Extraction : 2 types de kit testés : Minikit et Microkit Qiagen
→ **kit retenu** : Microkit

- PCR en temps réel (ABI 7500)

-Kits d'amplification: Mastermix et Corekit
→ **kit retenu** : Corekit pour une meilleure sensibilité
→ **seuil de détection** : 4 conidies

- Constitution de la gamme standard ADN génomique et ADN plasmidique

→ **pas d'inhibiteur produit par l'extraction** des bandes de capture avec l'éther.

Perspectives

- Finalisation de la mise au point: gamme standard plasmidique, extraction de l'ADN à partir des bandes de capture
- Acquisition de données sur une parcelle non traitée pendant 2 cycles de culture pour quantifier les densités des inoculums conidiens et ascospores.